

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-221837

(43)Date of publication of application : 14.09.1988

(51)Int.Cl.

B01J 13/02

A61K 9/10

(21)Application number : 62-053676

(71)Applicant : DAI ICHI SEIYAKU CO LTD

(22)Date of filing : 09.03.1987

(72)Inventor : KIKUCHI HIROSHI
YAMAUCHI HITOSHI
HIROTA SADA0
UCHIUMI HIDEO
HAMADA AKIRA

(54) LIPID FILM COMPOSITION

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a superior microcirculation in vivo and enable maintenance of drug concentrations at a high level in the blood by preparing a lipid film composition containing glycophorin and ganglioside.

CONSTITUTION: Glycophorin and ganglioside are used after premelting or dispersing and mixing in a solvent with another lipid component which is an anyshipathic property to both oil and water having a polarity part and a non- polarity part in molecules at the time of preparing a lipid film composition. Ribosome, microemulsion, fatty emulsion, etc. are used as lipid film composition. Glycophorin is sialoglycoprotein, and is obtained generally by extraction from the erythrocyte membrane of animals. Ganglioside is a sialoglycolipid, and ganglioside GM1, GM2, GM3, GD1 which have sialic acid at the end of a sugar chain are available.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-221837

⑪ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)9月14日

B 01 J 13/02
A 61 K 9/10

3 2 7

Z-8317-4G
6742-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全10頁)

⑭ 発明の名称 脂質膜構造体

⑮ 特 願 昭62-53676

⑯ 出 願 昭62(1987)3月9日

⑰ 発 明 者 菊 池 寛 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑱ 発 明 者 山 内 仁 史 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑲ 発 明 者 広 田 貞 雄 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑳ 発 明 者 内 海 英 雄 神奈川県横浜市港北区太尾町1290

㉑ 発 明 者 濱 田 昭 東京都文京区向丘2-24-10

㉒ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

明 細 書

1. 発明の名称

脂質膜構造体

2. 特許請求の範囲

グリコホリン及びガングリオシドを含有する脂質膜構造体。

3. 発明の詳細な説明

本発明は脂質膜構造体、更に詳しくはグリコホリン及びガングリオシドを含有する脂質膜構造体に関する。

<産業上の利用分野>

本発明の脂質膜構造体は肝、脾、肺などの細網内皮系組織に捕捉されにくく、体内で微小循環性を有し、血中での薬物濃度を高く維持することのできる医療上有用なものである。

<従来の技術>

一般に静脈内投与されたリボソームは、肝臓、脾臓、肺臓などの細網内皮系組織(以下、RES)に分布しやすいことが知られている。この性質はリボソームに限らず脂肪乳剤、エマルジョン製

剤、マイクロカプセルなどに共通のものであり、これは本製剤が生体にとっては非自己である異物であるための必然的な結果であるともいえる。またこのことが、上記の剤型を静脈内投与などの全身投与において薬物の放出をコントロールできる徐放性製剤として利用するのに、大きな障壁となっていると言っても過言ではない。

従来から、上記製剤が全身投与においても体内で微小循環性を有するようにする工夫はなされてきている。例えばリボソームの場合、他の製剤に比べてサイズのコントロールがしやすいことやサイズを小さくできることを利用し、小さな一枚膜リボソームを用いて肝や脾などのRESへの分布を抑制させ薬物の血中濃度を高く維持させる例〔バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ、761, 142(1983)〕が報告されている。またリボソームの場合は、その膜組成を比較的自由に換えられることを利用して血中での安定性を向上させ、微小循環性を有するようにする工夫もなされている。即ち相転移温度の高いレシチンを利用する例

【バイオケミカルファーマコロジー、12、3381 (1983)】、レシチンの代りにスフィンゴミエリンを用いる例【Biochemical Pharmacology、32、609 (1983)】、膜成分としてコレステロールを添加する例【バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ、161、142(1983)】などがある。

更に近年は赤血球膜由来である糖蛋白質、グリコホリンが注目され、これをリボソーム膜に再構成すると、リボソームはRESに存在する貧血細胞に貧血されにくくなり【砂本順三、第8回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム講演要旨集、P.19 (岡山、1985年)】、静脈内投与すると比較的安定に血中を微小循環できるようになる【内海英雄、濱田昭ら、日本薬学会第106年会講演要旨集、P.336(千葉、1986年)】と報告されている。

しかしながら上記した如く静脈内投与した場合でも、RESを回避して血中を微小循環できるリボソーム製剤の研究は盛んに行われてきているが、その効率の面を考えると、必ずしもその目的が十分に達成されたとは言えない現状にある。

又、それらの混合物を用いても良い。

ガングリオシドとは、シアロ糖脂質であり糖鎖端にシアル酸を有するガングリオシドGM₁、GM₂、GM₃、GD1a、GD1b、GD₃、GQ1b、GT1bなどが例としてあげられるが、これらを単独でもしくは混合物として用いればよい。

本発明にかかわる脂質膜構造体としては極性脂質の極性基が界面の水相に向って配列した膜構造を有する粒子を意味し、その例としてはリボソーム、マイクロエマルジョン、脂肪乳剤等があげられる。

本発明のグリコホリン及びガングリオシドを含有する脂質膜構造体の調製は公知の方法に従えばよい。即ちグリコホリン及びガングリオシドを、分子内に極性部及び非極性部を有し水及び油のいずれにも親和性を有する両親媒性物質である他の脂質膜成分とともに脂質膜構造体調製時にあらかじめ溶媒に溶解または分散混合して用いればよい。

＜発明が解決しようとする問題点＞

本発明者等は、効率的にかつ再現性よく、肝、脾、肺などの細網内皮系組織に捕捉されずに体内を微小循環できる脂質膜構造体について鋭意検討した結果、本発明を完成した。

＜発明の構成＞

本発明はグリコホリン及びガングリオシドを含有する脂質膜構造体に関する。

本発明にかかわるグリコホリンとは、シアロ糖蛋白質であり一般には動物の赤血球膜から抽出して得られる。赤血球としてはヒト、ブタ、ウマ、イヌ由来のものなどがあげられるが、本脂質膜構造体を臨床の場でヒトに投与する場合にはヒト赤血球由来のグリコホリンを、動物薬として動物に投与する場合にはその動物由来のグリコホリンを用いることが望ましい。またヒト赤血球グリコホリンの場合には、現在その蛋白質部分のアミノ酸配列の違いによりグリコホリンA、グリコホリンB、グリコホリンCの3種が同定されているが、本発明においてはそれらを単独で用いても良く、

例えばリボソームの場合、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質やジアルキル型合成界面活性剤等の膜形成主成分物質とグリコホリン及びガングリオシドとをあらかじめ混合し、これを公知の【アニュアル・レビュー・オブ・バイオフィジックス・アンド・バイオエンジニアリング 9、487(1980)】リボソームの調製法に従い処理することにより目的のリボソームを製造することができる。かかるリボソームは他の膜成分物質に膜安定化剤としてコレステロール、コレスタノール等のステロール類、ジアルキルホスフェート、ジアシルホスファチジン酸、ステアリルアミン等の荷電物質及びα-トコフェロール等の酸化防止剤等を含んでいても良い。

マイクロエマルジョンの場合、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル(Tween)、脂肪酸ナトリウム、ポリオキシエチレン、硬化ヒマシ油等の界面活性物質とグリコホリン及びガングリオシドとをあらかじめ混合し、これに大豆油等の油

脂を加えて公知のマイクロエマルジョンの調製法に従い処理することにより目的のマイクロエマルジョンを製造することができる。

また、脂肪乳剤の場合、ホスファチジルコリンとグリコホリン及びガングリオシドとをあらかじめ混合し、これに大豆油を加えて公知の脂肪乳剤の調製法に従い処理することにより目的の脂肪乳剤を製造することができる。

このようにして調製される本発明の脂質膜構造体が、RESを回避し、血中での微小循環性を有するようになるには、通常その調製工程において、グリコホリンの全脂質膜成分に対する割合を、重量分率で1/100以上にするのが望ましく、またガングリオシドは、グリコホリンに対して、重量比で0.02~2倍量にすることが望ましい。

本発明の脂質膜構造体が保持しうる薬物は脂質膜構造体の種類によって異なる。例えばリボソームが保持しうるものとしては特に制限がなく、水溶性薬物及び脂溶性薬物をあげることができる。またマイクロエマルジョンの場合には脂溶性薬物

回避して体内を微小循環させる新しい剤形の試みはリボソームにおいてのみ行われていたが、本発明においては、リボソームのみならず脂肪乳剤、マイクロエマルジョン等にも体内での微小循環性を付与することができる。

更に本発明の脂質膜構造体は、静脈内投与などの全身投与において微小循環性を有することができるが、皮下注射、筋肉内注射、関節腔内注射などにおいては本脂質膜構造体が体液中において安定であることを利用し局所投与における徐放性製剤として使用することも期待できる。

<実施例>

本発明を更に対照例、実施例及び試験例により説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

対照例1

L- α -ジバルミトイルホスファチジルコリン60 μ mol、コレステロール60 μ mol及びL- α -ジバルミトイルホスファチジン酸6 μ molをクロロホルム及びメタノールの混液(容積比2:1)に溶

を保持可能なものとしてあげることができ、中でも体内での代謝分解が速い薬物、尿中排泄が速い薬物など体内で有効に薬効を発現しにくいものが本発明の脂質膜構造体に保持させる薬物として適当と考えられる。具体的にはインターフェロン、インターロイキン、腫瘍壊死因子(TNF)、上皮成長因子(EGF)、エリスロポエチンなどの生理活性物質、プロスタグランジン、ステロイドなどのホルモン類、シトシンアラビノシドなどの抗癌剤等が適当な薬物としてあげられる。

本発明の脂質膜構造体において、グリコホリン及びガングリオシドは脂質膜構造体に硬水性相互作用を介して強固に結合して組込まれており、またモノマーとして遊離するものはほとんどないことをゲル濾過法により確認した。

<発明の効果>

本発明の脂質膜構造体は、優れた体内での微小循環性を有し、血中での薬物濃度を高く維持することができる、かつ再現性よく調製することができる。また従来の技術において、全身投与後RESを

かした。次に酸素ガス気流中で有機溶媒を除去してナス型コルベンのガラス壁にlipid filmを生成させた。ここに³H-イヌリン300 μ Clを含有する1 mMイヌリンのリン酸緩衝化生理食塩水(pH7.4以下PBSと略す)溶液7.5 mlを加えてボルテックス・ミキサーで攪拌振盪し、更に軽く超音波処理してリボソームの懸濁液を調製した。これを40~45℃に加温し、次いで0.4 μ mの孔径を有するポリカーボネート製メンブランフィルターに通過させ、粒径0.2 μ m以下のリボソームの懸濁液を調製した。次にこれを超遠心分離(15万×g、1時間、2回)し、上澄みを除去することによりリボソームに保持されなかったイヌリンを除去し、PBSを加えて最終的にイヌリンをその内水相に保持するリボソーム懸濁液を得た。この時PBSは、L- α -ジバルミトイルホスファチジルコリンのコリン基を酵素法により定量することによりホスファチジルコリン濃度が60 μ mol/7.5 ml - 8 μ mol/mlとなるように、量を加減して加えた。

対照例2

対照例 1 の脂質に更にヒト赤血球由来グリコホリン A を 5 μg 加えて、これをクロロホルム、メタノール及び水の混液（容積比150:75:1）に分散溶解させる以外は対照例 1 と同様に操作し、最終的にホスファチジルコリン濃度が 8 μmol/ ml となるリボソーム懸濁液を得た。

対照例 3

ヒトグリコホリン A 5 μg の代りにヒトグリコホリン A 15 μg を用いる以外は対照例 2 と同様に操作し、リボソーム懸濁液を得た。

対照例 4

L-α-ジバルミトイルホスファチジルコリン 60 μmol、コレステロール 60 μmol 及びヒトグリコホリン A 3 μg をクロロホルム、メタノール及び水の混液（容積比150:75:1）に分散溶解させる以外は対照例 1 と同様に操作し、最終的にホスファチジルコリン濃度が 8 μmol/ ml となるリボソーム懸濁液を得た。

対照例 5

ヒトグリコホリン A 3 μg の代りにヒトグリコ

ホリン A 9 μg を用いる以外は対照例 4 と同様に操作し、リボソーム懸濁液を得た。

上記対照例 1 ～ 5 の処方を以下の表 1 に示す。

表 1

対照例 5	対照例 4	対照例 3	対照例 2	対照例 1	方 法
10 μmol	10 μmol	10 μmol	10 μmol	10 μmol	L-α-ジバルミトイルホスファチジルコリン
10 μmol	10 μmol	10 μmol	10 μmol	10 μmol	コレステロール
—	—	1 μmol	1 μmol	1 μmol	L-α-ジバルミトイルホスファチジン酸
1.5 μg	500 μg	2.5 μg	1 μg	—	ヒトグリコホリン A
1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	1 ml イヌリン ^{a1)} の PBS 溶液

a1) 1 ml あたり 40 μCi の ³H-イヌリンを含む

参考例 1

前述の ³H-イヌリン 300 μCi を含有する 1 ml イヌリンの PBS 溶液 7.5 ml の一部をとり、PBS にて 20 倍に希釈して、1 ml あたり 2 μCi のイヌリンを含有する溶液を調製した。

対照例 6

スフィンゴミエリン 84 μmol、コレステロール 36 μmol、L-α-ジバルミトイルホスファチジン酸 12 μmol をクロロホルム及びメタノールの混液（容積比 2:1）に溶かすこと以外は対照例 1 と同様に操作し、最終的にスフィンゴミエリン濃度が 11.2 μmol/ ml となるリボソーム懸濁液を得た。

対照例 7

L-α-ジバルミトイルホスファチジン酸 12 μmol の代わりにヒトグリコホリン A 3 μg を用いて、これをクロロホルム、メタノール及び水の混液（容積比150:75:1）に分散溶解させる以外は対照例 6 と同様に操作し、リボソーム懸濁液を得た。

対照例 8

対照例 6 の脂質に更にガングリオシド GM₃ を 0.54 μmol 加える以外は対照例 6 と同様に操作し、リボソーム懸濁液を得た。

実施例 1

対照例 7 の脂質に更にガングリオシド GM₃ を 0.54 μmol 加える以外は対照例 7 と同様に操作し、リボソーム懸濁液を得た。

上記対照例 6 ～実施例 1 の処方を以下の表 2 に示す。

表 2

処 方	対照例 6	対照例 7	対照例 8	実施例 1
スフィンゴミセリン	14 μmol	14 μmol	14 μmol	14 μmol
コレステロール	6 μmol	6 μmol	6 μmol	6 μmol
L- α -ジパルミトイル ホスファチジン酸	2 μmol	—	2 μmol	—
ヒトグリコホリン A	—	500 μg	—	500 μg
ガングリオシド GM ₃	—	—	0.03 μmol	0.03 μmol
1 mM イヌリン ^(*) の PBS 溶液	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml

(*) 1 ml あたり 40 μCi の ³H-イヌリンを含む

対照例 9

L- α -ジパルミトイルホスファチジルコリン 84 μmol 、コレステロール 36 μmol 、L- α -ジパルミトイルホスファチジン酸 12 μmol をクロロホルム及びメタノールの混液（容積比 2:1）に溶かすこと以外は対照例 1 と同様に操作し、最終的にホスファチジルコリン濃度が 11.2 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ となるリボソーム懸濁液を得た。

対照例 10

L- α -ジパルミトイルホスファチジン酸 12 μmol の代わりにヒトグリコホリン A 3 mg を用いて、これをクロロホルム、メタノール及び水の混液（容積比 150:75:1）に分散溶解させる以外は対照例 9 と同様に操作し、リボソーム懸濁液を得た。

対照例 11

対照例 9 の脂質に更にガングリオシド GM₃ を 0.54 μmol 加える以外は対照例 9 と同様に操作し、リボソーム懸濁液を得た。

実施例 2

対照例 10 の脂質に更にガングリオシド GM₃ を 0.54 μmol 加える以外は対照例 10 と同様に操作し、リボソーム懸濁液を得た。

上記対照例 9 ～実施例 2 の処方を以下の表 3 に示す。

試験例 1

対照例 1, 2, 3, 4, 5 で得られたリボソームの懸濁液並びに参考例 1 で得られた³H- イヌリン溶液をそれぞれ50系雄性ラット (体重180 ~ 220g) の後肢静脈内に体重200gあたり0.5 ml (L- α- ジバルミトイルホスファチジルコリンとして4 μmol, 全脂質として約 8 μmol) 注入した。投与後15分、30分、2 時間、4 時間、6時間目に頸静脈より血液を約0.12 ml 採血し、このうち50 μl (n=2) を濾紙に滴下、乾燥後燃焼装置にて燃焼後液体シンチレーション法によりその放射活性を求めた。投与量に対する血中からの回収率 (%) はラットの全血液量を体重の6.5 %とみつまうて計算した。結果を表 4 に示した。

※1) 1 mlあたり40 μCi の³H-イヌリンを含む

表 3

処 方	対照例 9	対照例 10	対照例 11	実験例 2
L-α- ジバルミトイル ホスファチジルコリン	14 μmol	14 μmol	14 μmol	14 μmol
コレステロール	6 μmol	6 μmol	6 μmol	6 μmol
L-α- ジバルミトイル ホスファチジン酸	2 μmol	—	2 μmol	—
ヒトグリコホリン A	—	500 μg	—	500 μg
ガングリオシド MS ₉	—	—	0.05 μmol	0.05 μmol
1mM イヌリン ^{※1)} の PBS 溶液	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml

表 4

処 方	対照例 1	対照例 2	対照例 3	対照例 4	対照例 5	参考例 1
対 照	コントロール	グリコリン 1 μg	グリコリン 2.5 μg	グリコリン 500 μg	グリコリン 1.5 mg	イヌリン 単独
ラットの数	n=3	n=3	n=4	n=7	n=4	n=2
15分	n.d.	n.d.	n.d.	70.1±4.2	57.0±5.4	5.5±3.0
30分	34.8±5.0	34.3±8.9	42.2±12.0	64.8±6.4	51.0±5.5	2.0±1.3
2時間	5.6±1.4	14.1±11.0	16.0±5.1	30.7±7.9	32.7±5.5	0
4時間	3.1±0.9	5.4±7.2	2.3±2.0	20.1±8.2	19.7±4.3	0
6時間	2.8±2.0	1.0±1.4	0.1±0.2	13.0±7.5	13.8±3.6	0

表中の数値は血液から回収されるイヌリンの回収率(%) : 平均値±標準偏差 n.d.: 検定せず

表 4 から明らかなようにグリコリン単独の添加量を増すほどイヌリンは血中濃度が高く維持されることが明らかとなり、その効果には飽和が認められ、脂質 (ホスファチジルコリン+コレステロール) 20 μmol あたりグリコホリンを500 μg 以上添加してもそれ以上の効果は望めないことが確認された。

また同時に投与6時間後、ラットの頸動脈を切断放血させ開腹後、肝臓、肺臓、腎臓及び脾臓を摘出した。次にこれら臓器の一部または全部を取り、PBS 中でホモジェナイズしたのち液体シンチレーション法により放射活性を測定、投与量に対する回収率 (%) を求めた。結果を表 5 に示した。

平均値±標準偏差

臓器	投与量に対するイヌリンの回収率(%)			
	対照例6	対照例7	対照例8	実施例1
肝臓	53.0±3.3	53.5±2.8	55.0±5.0	37.7±2.3**
脾臓	2.1±1.2	0.1±0.0	0.4±0.1	0.1±0.0
腎臓	0.2±0.0	0.5±0.0	0.4±0.2	0.5±0.1
肺臓	6.2±1.7	7.4±2.2	4.1±1.7	9.8±4.5

参考例1のイヌリン単独ではどの臓器においてもほとんど分布せず。
 **）コントロール群(対照例6)に比べて有意差あり。

表 7

ンとして5.6 μmol 、全脂質として約 8 μmol) 注入する以外は試験例1と同様に操作した。

結果を表8(イヌリンの血中濃度推移)及び表9(イヌリンの組織分布)に示した。

表6から明らかなように血中濃度を高く維持する効果はガングリオシド単独修飾リボソーム(対照例8) < グリコホリン単独修飾リボソーム(対照例7) < グリコホリン及びガングリオシド修飾リボソーム(実施例1)であった。

また表7から明らかなようにRESへの分布抑制効果を検討すると本発明のグリコホリン及びガングリオシド修飾リボソームが有意差(1%危険率)をもって肝への分布抑制効果を有することが認められた。

以上から、グリコホリンに加えて更に糖脂質であるガングリオシドをリボソーム膜に添加することによりリボソームの肝への分布を抑制し、薬物の血中濃度を更に高く維持することが可能であることが確認された。

試験例3

対照例9、10、11並びに実施例2で得られたリボソーム懸濁液をそれぞれSD系雄性ラット(体重180~220g)の後肢静脈内に体重200gあたり0.5 ml (L- α -ジバルミトイルホスファチジルコリ

びガングリオシド修飾リボソーム（実施例2）でコントロールリボソームの場合より若干増す（有意差もあり）結果となったが、肝臓、肺臓、腎臓、脾臓を全て含めたRES 全体への分布としてみれば、グリコホリン単独修飾リボソーム（対照例10）やグリコホリン及びガングリオシド修飾リボソーム（実施例2）は分布が抑制効果を有することは明らかであり、その効果は後者が大であった。

以上から試験例2と同様、グリコホリンに加えてガングリオシドをリボソーム膜に添加することにより、リボソームのRES への分布を抑制し薬物の血中濃度を高くすることが可能であることが確認された。